

ANÁLISE DE ALIMENTOS PARA BOVINOS

Ana Rita Araújo Nogueira¹
Gilberto Batista de Souza²

1. Introdução

Além da escolha adequada do método analítico e do estudo de possíveis interferentes, torna-se essencial boa amostragem, preparação e solubilização da amostra para análise. Qualquer que seja o tipo de amostra, erros significativos poderão ser introduzidos se a etapa de preparação não for satisfatoriamente conduzida (PERSTORP ANALYTICAL - TECATOR, 1995).

A amostragem é a primeira fase da análise. É preciso haver integração entre os responsáveis pela coleta e o laboratório, buscando-se sincronismo entre a remessa de amostras e a capacidade do laboratório para executar as determinações (SILVA, 1981).

No Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Pecuária do Sudeste normalmente trabalhamos na preparação dos seguintes tipos de amostras: planta forrageira, feno, silagem, concentrado, fezes, ossos, pêlos, fígado, sangue, urina, líquidos (de rúmen, íleo e abomaso) e leite.

Em alguns casos, é necessário reduzir consideravelmente a dimensão da amostra antes que ela seja introduzida no sistema analítico e possa ser tratada convenientemente (Bruno et al., 1995). Para isso, algumas etapas são importantes, como, p. ex., a secagem e a moagem.

O método de preparação utilizado dependerá do tipo de amostra. O material coletado deve ser preparado em local apropriado e equipado para esta finalidade. Normalmente a atividade de preparação inclui o recebimento, o registro, o pré-acondicionamento, a secagem, a moagem, o acondicionamento e a rotulagem das amostras. Esta etapa é responsável por mais de 60% do tempo total da análise (Fig. 1), sendo conseqüentemente responsável por grande parte dos possíveis erros que ocorrem durante o procedimento laboratorial.

¹ Química Analítica, Dr., Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste

² Técnico de Nível Superior I da Embrapa Pecuária Sudeste.

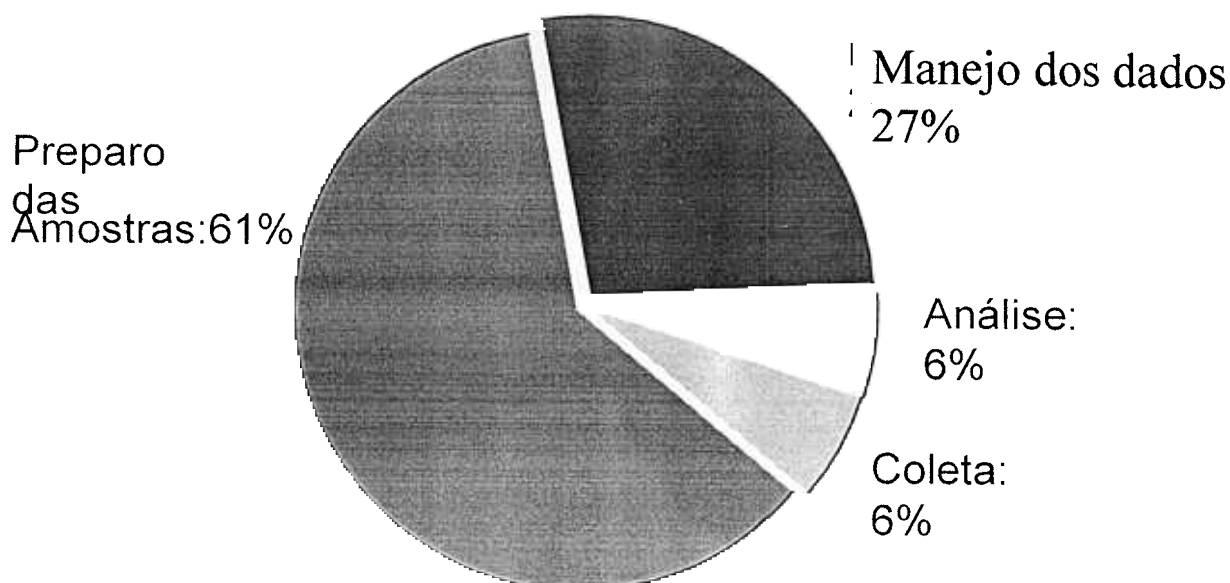


Figura 1 - Distribuição do Tempo para o preparo de Amostras.

Fonte: Majors (1991).

2. Aspectos Importantes Relacionados à Coleta de Amostras

Alguns cuidados devem ser observados, para garantir a integridade física e química do material coletado:

Evitar a coleta de amostras sujas de terra ou com excesso de água;

Identificar devidamente, com letras legíveis, o recipiente (saco de papel ou de plástico, potes plásticos, frascos, etc.) que receberá a amostra. Cuidado especial deve ser tomado com as amostras que serão armazenadas em baixa temperatura. Em muitos casos, a identificação feita inicialmente torna-se ilegível durante o processo de descongelamento;

Garantir que utensílios, embalagens e ferramentas empregados na coleta e no transporte não contaminem a amostra, principalmente em função das determinações que serão realizadas. Como exemplo, se de uma planta pretende-se determinar o teor de ferro, um facão utilizado para retirar a amostra não pode ter sido confeccionado com esse elemento. Em amostras provenientes de

experimentos conduzidos em casa de vegetação esse tipo de cuidado deve ser redobrado;

Documentar cada etapa da coleta, incluindo eventos não esperados (p. ex., chuvas).

Especificar todas as características relevantes da área, as condições climáticas a população amostrada e as condições de transporte e secagem;

Amostra deve ser encaminhada o mais rapidamente possível ao laboratório, para que possa ser devidamente processada, armazenada e analisada;

A amostra que chegar ao laboratório sem as informações necessárias para processamento e análise deve ser recusada. É necessário conhecer o tipo da amostra, o que deve ser determinado e quem é o seu responsável.

3. Objetivo da Preparação das Amostras

A preparação visa, principalmente (Silva, 1981; AOAC, 1990; Bruno et al., 1995):

Permitir o armazenamento de forma mais adequada e por período de tempo mais longo;

Diminuir problemas relacionados à homogeneidade das amostras;

Reduzir a dimensão da amostra;

Facilitar o ataque dos reagentes durante o processo analítico, pela diminuição do tamanho das partículas.

4. Preparação das Amostras

4.1. Recebimento

As amostras aqui abordadas são: plantas forrageiras, feno, silagem, resíduos agrícolas ou agro-industriais e concentrados.

Com relação ao recebimento de amostras, é importante ressaltar que:

São necessários, no mínimo, 15 g de material pré-sêco (65°C) e moído para que se possa realizar as principais determinações em estudos de nutrição animal [nitrogênio total, matéria seca a 105°C, fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina, digestibilidade “in vitro” da matéria seca, matéria orgânica (cinzas), extrato etéreo, energia bruta, macro e microelementos minerais];

Em experimentos que produzam pequena quantidade de amostras, devem ser discriminadas as determinações necessárias com a quantidade de material possível de se obter;

Para determinação de pH, ácidos graxos voláteis e nitrogênio amoniacal em silagem, coletar de 1,0 a 2,0 kg de amostra;

A perda de umidade, durante o transporte, não terá grande importância, desde que os resultados sejam expressos apenas na matéria seca total. No entanto, em amostras provenientes de silagem, a umidade é um bom indicador de sua qualidade, devendo-se após a coleta transferi-las para saco plástico, compactando para expelir o ar e imediatamente encaminhá-las para o laboratório para serem processadas;

Quando as determinações não forem realizadas imediatamente em amostras de forragens verdes, fezes, urina, etc., é necessário que as amostras sejam conservadas em baixas temperaturas (entre -18 e -20 °C).

As amostras de fezes são processadas praticamente da mesma maneira, mas diferenciam-se de outros tipos de amostras de origem animal e serão consideradas mais adiante no item 4.3.2.

4.2. Identificação e Registro

A identificação e o registro das amostras permitirão o rastreamento dos dados gerados, possibilitando ao pesquisador ou o cliente relacionar os códigos atribuídos pelo laboratório à identificação mais detalhada do experimento ou do trabalho a que os resultados se destinam.

O mínimo que é preciso incluir na etapa de identificação e registro é (Silva, 1981; AOAC, 1990; Bruno et al., 1995; Embrapa, 1996):

nome do solicitante da análise;

data de coleta;

data de recebimento das amostras;

tipo de material;

determinações a serem realizadas;

número-código de cada amostra; e

documentação de informações relevantes.

4.3. Pré-acondicionamento

Antes de concluir o processo de preparação das amostras, elas são pré-acondicionadas de diversas formas.

4.3.1. Amostras de origem vegetal

São pré-acondicionadas em sacos de papel ou de algodão com capacidade de 3 kg. Em cada saco, que deverá estar identificado com o número-código, são colocados aproximadamente 150 g da amostra.

Para determinação de carboidratos solúveis, ácidos graxos voláteis e nitrogênio amoniacal, parte da amostra deverá ser separada, identificada e imediatamente congelada, encerrando, nessa etapa, a preparação. A amostra só será descongelada horas antes da determinação (Embrapa, 1996).

4.3.2. Amostra de fezes

Para o pré-acondicionamento deste tipo de amostra empregam-se recipientes retangulares de vidro (tipo fôrma doméstica), colocando-se, em cada um, também aproximadamente 150 g da amostra.

Observação:

Quando solicitada, a determinação da matéria seca ao ar - ASA (amostra seca em estufa a 65°C com circulação forçada de ar) é feita após o pré-acondicionamento. Neste caso, é necessário obter o peso exato da amostra que é colocada na bandeja ou no recipiente de vidro. Os pesos anotados serão utilizados para o cálculo da porcentagem de matéria seca ao ar (% ASA).

4.4. Pré-Secagem

A pré-secagem das amostras tem os seguintes objetivos: facilitar o processo de moagem, conservar e prolongar a conservação da amostra pela destruição de enzimas responsáveis pelo processo de decomposição (Jones Junior & Steyn, 1973) e pela diminuição da atividade microbiológica (facilitada pela umidade) e permitir a determinação da ASA. No caso de ser necessário o valor da porcentagem de matéria seca, deve-se pesar a amostra antes e depois da pré-secagem.

Amostras de plantas destinadas a determinações de macro e microelementos minerais podem necessitar descontaminação antes da pré-secagem, devido a poeira ou resíduos de pulverização no local da coleta, dependendo dos elementos a serem determinados e das possibilidades de contaminação. Caso necessário, lavar as amostras com solução detergente neutra (entre 0,1 e 0,3% v/v) e em seguida com água desionizada. Este procedimento deve ser rápido, para se evitar perda de nutrientes durante a lavagem. Se as amostras estiverem secas ou murchas, é aconselhável não lavar com água.

A secagem é feita em sacos de papel ou de algodão limpos, em estufa com circulação de ar a temperatura de 65°C, por um período de 48 h ou até peso constante (Silva, 1981; Bruno et al., 1995). Para o caso de silagem, a pré-secagem deve ser feita a 45°C por 72 h. A carga de cada estufa deve estabelecida de tal modo que a circulação interna de ar não seja prejudicada.

Amostras de fezes que serão analisadas após secagem e moagem devem ser colocadas em bandejas limpas e secadas a 65°C durante 48 h ou até peso constante. Amostras que serão analisadas frescas devem ser colocadas em sacos plásticos, sendo então retirado o ar e congeladas até a sua manipulação.

Determinações de vitamina C, caroteno, etc. devem ser feitas na amostra fresca, porque tais compostos podem ser perdidos ou alterados durante o processo de secagem.

A pré-secagem é necessária quando a amostra possui alto teor de umidade.

Após secagem, a bandeja ou o saco de papel é retirado da estufa e posto sob condições ambientais do laboratório por pelo menos 1 h. Esse tempo é necessário para que a umidade da amostra entre em equilíbrio com a umidade do ambiente e atinja peso constante e para evitar erros de pesagem (movimentação de ar ascendente sobre a balança).

No caso de grãos, o seguinte procedimento para controle de qualidade da matéria prima é adotado nas indústrias: pré-secagem a 45°C por 24 h; em seguida, o grão é triturado ou quebrado e colocado em estufa por 1 h a 130°C para determinação da matéria seca.

4.5. Moagem

A moagem das amostras é feita em moinho do tipo Wiley, com facas, com peneiras de 1 mm, sendo coletado apenas o que passa na peneira (Silva, 1981; AOAC, 1990; PERSTORP ANALYTICAL - TECATOR, 1995; Embrapa, 1996). Toda superfície que tenha contato com a amostra deve ser de aço inoxidável.

A moagem é realizada em amostras que apresentam elevado teor de matéria seca (> 80%). Se a amostra for constituída de pó fino, capaz de atravessar a peneira de malha 40, bastará homogeneizá-la e reduzi-la, com auxílio do quarteador, à porção destinada à análise.

O procedimento a ser utilizado na moagem, entre uma amostra e outra, é o seguinte:

- ao retirar a amostra, abrir o moinho e limpar adequadamente seu interior, não deixando material que possa contaminar a amostra seguinte;

- fechar novamente o moinho, colocando pequena quantidade da próxima amostra;

- descartar esta quantidade moída;

- colocar o restante do material, coletando o material moído.

Para quantidades pequenas de amostras, o melhor é empregar micromoinhos. Não sendo possível, aproveitar todo o material, inclusive o que fica retido na peneira. No caso de algumas amostras, como por exemplo caroço de algodão, é necessário usar moinho especial ou tratar a amostra (HCl p.a., concentrado), para facilitar a moagem.

4.6. Acondicionamento

Após a moagem, as amostras são acondicionadas em frascos com tampa, com capacidade aproximada de 150 mL, identificados com o número-código (Jeffery et al., 1992; Ferreira & Gomes, 1995).

Alguns cuidados devem ser tomados nesta fase:

- utilizar embalagem limpa e seca, que garanta a ausência de interação entre o ambiente e a amostra;

- a embalagem deverá estar adequadamente rotulada;

ideal é analisar as amostras logo após a moagem. Não sendo possível, armazenar em local fresco (de preferência refrigerado) e protegido da luz; e,

é necessário lavar as embalagens destinadas ao armazenamento, levando-se em conta os tipos de determinações a serem realizadas. No caso de se determinar macro e microelementos, além da lavagem com solução detergente neutra, recomenda-se a lavagem com solução de HCl p.a., a 10% (v/v) e em seguida com água desionizada.

Ao final do acondicionamento, as amostras seguem para o laboratório, acompanhadas de formulário de registro, estando prontas para serem analisadas.

Quando se tratarem de amostras de fezes contendo marcadores, como, p. ex., cromo ou cobalto, procurar agrupar os tempos de coleta (um grupo: T₀ - Animal 1, T₀ - Animal 2, ...; outro grupo: T₁ - Animal 1, T₁ - Animal 2, ...; etc.). Com isso, o que se pretende é minimizar contaminações entre as amostras, ou seja, processa-se primeiro as de baixa concentração, indo em direção às mais concentradas.

Em todo o trabalho de preparo de amostra é recomendável o uso de luvas e máscara.

5. Análise de Alimentos para Bovinos

A seguir são listados alguns dos procedimentos analíticos atualmente realizados no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Pecuária Sudeste.

5.1. Determinação da matéria seca: (AOAC 1990):

Pré-secagem - em estufa calibrada a 65°C por 72 h, ou até peso constante.

Moagem – em moinho de facas tipo Wiley, coletando a amostra que passou pela peneira de malha 40.

Secagem a 105°C – transferir para pesa-filtro de 1 a 2 g de amostra moída, deixar em estufa calibrada a 105°C por aproximadamente 8 h ou até peso constante.

5.2. Determinação da proteína bruta: (AOAC 1990):

Método micro – baseado na decomposição da matéria orgânica pelo ácido sulfúrico e na quantificação do nitrogênio utilizando sistema de destilação por arraste a vapor (método proposto por Kjeldahl, em 1883).

5.3. Determinação da fibra em detergente neutro, FDN : (Van Soest, 1965):

Com solução detergente neutra solubiliza-se o conteúdo celular composto basicamente de proteínas solúveis, açúcares, lipídeos, nitrogênio não-proteico,

pectina, amido e outros constituintes solúveis em água. A porcentagem dos constituintes da parede celular, parte da forragem insolúvel em detergente neutro, que é basicamente constituída de celulose, hemicelulose, lignina e proteína lignificada, é obtida por diferença entre as pesagens da amostra antes e depois de sua solubilização.

5.4. Determinação da fibra em detergente ácido FDA, (Van Soest, 1965):

Utilizando-se de reagentes específicos, a amostra é tratada com uma solução denominada detergente ácido (SDA), a qual solubiliza o conteúdo celular, a hemicelulose e a maior parte da proteína insolúvel; no entanto, o nitrogênio lignificado, a lignina solúvel em álcali, a lignina insolúvel, a celulose e a sílica, fazem parte do resíduo, denominado de fibra em detergente ácido (FDA).

5.5. Determinação da lignina (Van Soest e Wine, 1968):

Butler & Bailey (1973), referem-se à lignina como um polímero 3-metóxi-fenil-propenol e 3-5-dimetóxi-fenil-propenol, ligados em proporções variadas e em sequência casualizada, originando assim grande variedade de produtos, o que dificulta a sua exata definição. Por meio do resíduo lignocelulósico da fibra em detergente ácido, a lignina é oxidada e solubilizada por meio de uma solução de ácido sulfúrico a 72%.

5.6. Determinação das cinzas ou matéria mineral (Silva, 1981):

A amostra é calcinada em forno de mufla (550°C – 600°C) para eliminar a matéria orgânica e substâncias voláteis. Por diferença de pesagem, entre o peso do cadinho vazio e o peso do cadinho com o resíduo, encontra-se o teor das cinzas.

5.7. Determinação do extrato etéreo (Silva, 1981):

A determinação do extrato etéreo consiste na solubilização pelo éter das gorduras ou lipídeos. Esta solubilização é feita em extrator do tipo Soxhlet, utilizando-se o éter etílico como solvente, em que a amostra é submetida ao refluxo contínuo, por um período de tempo capaz de extrair toda fração a solúvel no éter.

5.8. Determinação da digestibilidade “in vitro” da matéria seca (Tilley & Terry, 1963):

O alimento é incubado por 48 h, em que ocorrerá fermentação pelos microrganismos do líquido de rúmen, sob condições anaeróbicas, temperatura de 39°C, poder tampão a pH de 6,9; após será submetido por mais 48 h a fermentação por solução ácida de pepsina.

5.9. Determinação dos macros e micros nutrientes:

Macros nutrientes: cálcio, magnésio, fósforo, potássio e enxofre

Micros nutrientes: cobre, zinco, manganês e ferro

Utiliza-se o método de decomposição por via úmida que é mais utilizado para solubilização de material vegetal. As amostras são solubilizadas com ácidos oxidantes em mistura $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$. A maioria das amostras é totalmente oxidada, deixando os elementos a serem determinados na solução ácida em formas inorgânicas simples e apropriadas para análise. As determinações analíticas do Ca, Mg, Cu, Zn, Mn e Fe são realizadas por espectrometria de absorção atômica por chama, o fósforo é determinado por espectrofotometria de absorção molecular em sistema de análise por injeção em fluxo contínuo, medindo-se a intensidade da cor produzida pelo complexo vanadomolibdofosfórico; o potássio é determinado por fotometria de chama; e o enxofre por turbidimetria do sulfato de bário (Malavolta, 1989).

6. Referências Bibliográficas

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC 15 ed. Official Methods of Analysis. Virginia, 1990. 1298p., 2 v.
- BUTLER, G.W.; BAILEY, R.W. 1973. Chemistry and Biochemistry of Forage. Academic Press, London, Vol. I, 416P.
- BRUNO, O.A.; CASTRO, H.; COMERÓN, E.A.; DIAZ, M.C.; GUAITA, S.; GAGGIOTTI, M.C.; ROMERO, L.A. Técnicas de muestreo y parametros de calidad de los recursos forrajeros. Argentina: Publi, 1995. 14p. (INTA – Estacion Experimental Agropecuaria Rafaela. Publicacion, 56).

- COMPÊNDIO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO ANIMAL. In: Métodos Analíticos. ANFAR, SINDIRAÇÕES, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. São Paulo.p.13. 1998.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (Juiz de Fora, MG). Metodologias de análises. Juiz de Fora, 1996.
- GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. Forage Fiber Analysis (Apparatus, reagents, procedures and some applications). Agric. Handb. Forest Serv. U. S., Washington, v.379, p.1-20, 1970.
- VOGEL, A.; JEFFERY; G.H.; BASSETT; J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R.C. Vogel: análise química quantitativa. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 712p.
- JONES JR.; J.B.; STEYN, W.J.A. Sampling, handling and analyzing plant tissue samples. In: WALSH, L.M.; BEATON, J.D. Soil testing and plant analysis. Madison: Soil Science Society of America, 1973. P. 249-270.
- MAJORS, An overview of sample preparation, LC-GC, vol. 9(1), 1991.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S. A. de. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989. 201p.il.
- MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A.; BLOCH, M. de F. M. Análise química de tecido vegetal. Londrina, IAPAR, 1992. 17p ilustr. (IAPAR. Circular, 74).
- NOGUEIRA, A.R. DE A.; MACHADO, P.L.O DE A.; SANTANA DO CARMO, C.A.F. DE; FERREIRA , J.R.. Manual de Laboratório: Solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos – 1. Coleta, acondicionamento e Preparo de Amostra, EMBRAPA – CPPSE, 1998. 72p.: il.
- PERSTORP ANALYTICAL – TECATOR. Fiber determination, using the Fibertec I & M Systems. 1995. 8p (Aplicação Note NA 304)
- SILVA, D.J. Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos). Viçosa, UFV, 1981. 166p.
- SILVA, F.V.; NOGUEIRA, A.R.A.; SOUZA, G.B; ZAGATTO, E. A. G. A Polyvalent Flow Injection System for Spectrophotometric Plant Analysis, Anal. Chim. Acta, 370, 39-46 (1998).
- TILLEY, J.M.A.; TERRY, R-A. 1963. A two-stage technique for the " in vitro " digestion of forage crops. J. Brit. Grassl. Soc., 18(2):104-111.
- VAN SOEST, P.J.; WINE, R.H. 1968. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. J. Assoc. Official Agr. Chem., 51:780-85.

- VAN SOEST, P.J. 1963 Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. A rapid method for the determination of fiber and lignin. J. Assoc. Official Agr. Chem. 46(5):829-835.
- VAN SOEST, P.J. 1964 Symposium on nutrition and forage and pastures. New chemical procedures for evaluating forages . J.Anim. Sci., 23(3):838-45.
- VAN SOEST, P.J. 1965. Symposium on Factors Influencing the Voluntary Intake of Herbage by Ruminants: Voluntary Intake in Relation to Chemical Composition and Digestibility. J. Anim. Sci. 24(3):834-43.
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Symposium: Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci., v.74, p.3583-97. 1991.